

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international



(43) Date de la publication internationale
6 novembre 2003 (06.11.2003)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 03/090727 A1

(51) Classification internationale des brevets⁷ : A61K 9/51,
B01J 13/00

Université Toulouse 3 - 118 route de Narbonne, F-31062
Toulouse Cedex (FR).

(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR03/01278

(74) Mandataires : CABINET PLASSERAUD etc.; 84 rue
d'Amsterdam, F-75440 PARIS CEDEX 09 (FR).

(22) Date de dépôt international : 23 avril 2003 (23.04.2003)

(81) États désignés (*national*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
02/05312 26 avril 2002 (26.04.2002) FR

(84) États désignés (*régional*) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) :
FLAMEL TECHNOLOGIES [FR/FR]; 33 Avenue du
Docteur Georges Lévy, F-69200 VENISSIEUX (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : CAIL-
LOL, Sylvain [FR/FR]; 8 rue du Mont Doré, Appt. 27,
F-75017 Paris (FR). MEYRUEIX, Rémi [FR/FR]; 42,
rue H. Berlioz, Le Bois Saint Rambert, F-69009 Lyon
(FR). BRYSON, Nathan [FR/FR]; 120, rue Du Coteau,
F-69390 Millery (FR). SOUM, Alain [FR/FR]; Labora-
toire LCPO-ENSCPB, 16 avenue Pey-Berland, F-33607
Pessac Cedex (FR). SOULA, Gérard [FR/FR]; 33, rue
Nungesser, F-69330 Meyzieu (FR). MINGOTAUD,
Anne-Françoise [FR/FR]; Laboratoire IMRCP - Bât.221,

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale
— avant l'expiration du délai prévu pour la modification des
revendications, sera republiée si des modifications sont re-
çues

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.

(54) Title: COLLOIDAL SUSPENSION OF SUBMICRONIC PARTICLES FOR DELIVERING ACTIVE PRINCIPLES AND
METHOD FOR PREPARING SAME

(54) Titre : SUSPENSION COLLOIDALE DE PARTICULES SUBMICRONIQUE DE VECTORISATION DE PRINCIPES AC-
TIFS ET LEUR MODE DE PREPARATION

(57) Abstract: The invention concerns a suspension of particles for delivering active principles, in particular proteins. Said particles are based on a diblock copolymer consisting of a neutral hydrophobic alpha hydroxy carboxylic acid polymer block and a hydrophilic linear polyaminoacid block with peptide alpha chaining, at least partly ionized. Said alpha hydroxy carboxylic acid polymer/ linear polyaminoacid delivery particles spontaneously obtainable in the absence of surfactant can be stable. Said delivery particles are capable of being associated undissolved in colloidal suspension with at least an active principle and of delayed or prolonged release thereof. The invention also concerns a powdery solid from which are derived the delivery particles and the preparation of said solid and said delivery particle suspension.

(57) Abrégé : L'invention concerne une suspension de particules de vectorisation (PV) de principes actifs (PA) en particulier de protéines. Ces PV sont à base d'un copolymère dibloc formé d'un bloc de Polymère d'Acide Alpha HydroxyCarboxylique (PAHC) neutre hydrophobe et d'un bloc de polyaminoacide(s) linéaire(s) hydrophile(s) à enchainement alpha peptidique polyAAI, ionisés au moins en partie. Ces PV PAHC/polyAAI peuvent être obtenues spontanément en l'absence de tensioactif et être stables. Ces PV sont aptes à s'associer en suspension colloïdale à l'état non dissous avec au moins un PA et à libérer celui ci de façon retardée ou prolongée. L'invention vise également un solide pulvérulent à partir duquel sont issues les PV, ainsi que la préparation de ce solide et de cette suspension de PV.



WO 03/090727 A1

SUSPENSION COLLOIDALE DE PARTICULES SUBMICRONIQUES DE VECTORISATION DE PRINCIPES ACTIFS ET LEUR MODE DE PREPARATION

Le domaine de la présente invention est celui des Particules de Vectorisation (**PV**),
5 utiles pour l'administration de principes actifs (**PA**). Ces derniers sont, de préférence, des
médicaments ou des nutriments pour l'administration à un organisme animal ou humain
par voie orale ou nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire,
intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale, parentérale, etc... En terme de nature
chimique, les **PA** plus particulièrement mais non limitativement concernés par l'invention
10 sont hydrophiles ou amphipiles, par exemple, des protéines, des glycoprotéines, des
peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des polynucléotides et des
molécules organiques.

La présente invention concerne, plus précisément, des suspensions colloïdales de
Particules de Vectorisation, avantageusement de type submicronique, à base de blocs de
15 polymères hydrophobes et de blocs de polyaminoacides hydrophiles, du type polyGlu.

La présente invention vise aussi bien des particules nues en tant que telles, que les
systèmes de vectorisation de **PA**, constitués par les particules chargées par le (ou les) **PA**.

La présente invention a également trait à des solides pulvérulents comprenant
ces **PV**. L'invention concerne, également, des procédés de préparation desdites
20 suspensions colloïdales de particules, chargées en **PA**.

L'encapsulation de **PA** dans les **PV** a notamment, pour but de modifier leur durée
d'action et/ou de les acheminer au lieu du traitement et/ou augmenter la biodisponibilité
desdits **PA**. De nombreuses techniques d'encapsulation ont déjà été proposées. De telles
techniques visent, d'une part, à permettre le transport du **PA** jusqu'à son site d'action
25 thérapeutique, tout en le protégeant contre les agressions de l'organisme (hydrolyse,
digestion enzymatique, etc.) et, d'autre part, à contrôler la libération du **PA** sur son site
d'action, afin de maintenir la quantité disponible pour l'organisme au niveau désiré. Les
PA concernés par ces avatars de transport et de séjour dans l'organisme sont, par exemple,
des protéines mais peuvent être, également, des produits tout autres, des molécules
30 organiques d'origine synthétique ou naturelle. La revue de M.J. HUMPHREY (Delivery
system for peptide Drugs, éditée par S. DAVIS et L. ILLUM, Plenum Press, N.Y. 1986),
fait état de la problématique concernant l'amélioration de la biodisponibilité des **PA** et
l'intérêt des systèmes de vectorisation et de libération contrôlée.

Parmi tous les matériaux envisageables pour former des **PV**, les polymères sont de
35 plus en plus utilisés, du fait de leurs propriétés intrinsèques. S'agissant du cahier des

charges que l'on souhaite obtenir pour les **PV**, il est particulièrement exigeant et comprend, notamment, les spécifications suivantes.

- 1 La première spécification recherchée serait que les **PV** aient avantage à
5 pouvoir former, sans l'aide de solvant organique et/ou de tensioactif, une
suspension aqueuse stable
- 2 Il est souhaitable que les **PV** et les systèmes **PV-PA** puissent être obtenus par
un procédé non dénaturant pour le **PA**.
- 3 Une autre spécification recherchée serait que le polymère constituant les **PV**,
10 soit biocompatible, éliminable (par excrétion) et/ou biodégradable et, encore
mieux, qu'il soit métabolisé en produits non toxiques pour l'organisme. En
outre, il conviendrait que la biodégradation dans l'organisme soit d'une durée
suffisamment courte.
- 4 Il serait également souhaitable que les **PV** aient une taille suffisamment faible
15 pour pouvoir subir, en suspension dans un liquide, une filtration stérilisante
par un filtre dont le diamètre des pores est inférieur ou égal à 0,2 μm .
- 5 Les **PV** devraient, avantageusement, permettre de contrôler la vitesse de
libération du **PA**.
- 6 Une autre spécification importante serait que les systèmes **PV-PA** puissent
20 constituer d'excellents médicaments injectables. Cette aptitude améliorée de
l'administration par injection - e.g. intraveineuse, sous-cutanée ou
intramusculaire – « injectabilité » se caractérise par :
(i) un volume injecté réduit (pour une dose thérapeutique donnée),
(ii) une viscosité faible.
Ces deux propriétés sont satisfaites lorsque la dose thérapeutique de **PA** est
25 associée à une quantité minimale de **PV**. En d'autres termes, les **PV** doivent
avoir un fort taux de chargement en **PA**.
- 7 Le coût propre aux **PV** dans une préparation injectable doit être réduit et là
encore il convient que les **PV** aient un fort taux de chargement en **PA**. En
définitive, la faible taille et un fort taux de chargement sont des spécifications
30 majeures recherchées pour les **PV**.
- 8 Il est également avantageux que le polymère, constitutif des **PV**, n'induisse pas
de réponse immunitaire.
- 9 Pour la famille de **PA** hydrophiles et amphiphiles, en particulier les protéines,
il conviendrait d'avoir des **PV** qui soient adaptés à cette famille de **PA** en
35 termes de facilité d'association et de libération et en termes de caractère non
dénaturant.

Les propositions techniques antérieures, décrites infra, ont tenté de satisfaire l'ensemble de ces spécifications. A titre d'illustration, on citera les propositions antérieures (a) à (j) :

- 5 (a) Le brevet US-A-5 286 495 concerne un procédé d'encapsulation par vaporisation de protéines en phase aqueuse, à l'aide de matériaux ayant des charges opposées, à savoir : l'alginate (chargé négativement) et la polylysine (chargée positivement). Ce procédé de fabrication permet de produire des particules de taille supérieure à 35 μm .
- 10 (b) Par ailleurs, les techniques d'émulsion sont couramment utilisées pour préparer des microparticules chargées de **PA**. Par exemple, les demandes de brevets WO 91/06286, WO 91/06287 et WO 89/08449 divulguent de telles techniques d'émulsion dans lesquelles on a recours à des solvants organiques pour solubiliser des polymères, par exemple de type polylactique. Mais il s'est avéré que les solvants peuvent être dénaturants, notamment pour les **PA** peptidiques ou polypeptidiques.
- 15 (c) On connaît, également, des **PV** biocompatibles appelées protéinoïdes, décrites dès 1970 par X. FOX et K. DOSE dans « Molecular Evolution and the origin of Life », Ed. Marcel DEKKER Inc (1977). Ainsi, la demande de brevet WO 88/01213 propose un système à base d'un mélange de polypeptides synthétiques, dont la solubilité dépend du pH. Pour obtenir les microparticules matricielles selon cette invention, ils solubilisent le mélange de polypeptides, puis avec un changement de pH, ils provoquent la précipitation de particules protéinoïdes. Lorsque la
- 20 précipitation s'effectue en présence d'un **PA**, celui-ci est encapsulé dans la particule.
- 25 (d) On mentionnera également, pour mémoire, le brevet US 4 351 337 qui relève d'un domaine différent de celui de la vectorisation de **PA** propre à l'invention. Ce brevet divulgue des implants massiques fixés et localisés à des endroits bien précis de l'organisme. Ces implants sont des tubes ou des capsules creuses de taille microscopique (160 μm et de longueur égale à 2 000 μm), constitués de copolymères de copoly(aminoacides) – e.g. poly(acide glutamique-leucine) ou poly(benzylglutamate-leucine) – obtenus par copolymérisation de monomères de N-carboxyanhydrides d'aminoacides (NCA). L'inclusion d'un **PA** s'opère par une
- 30 technique d'évaporation de solvant d'un mélange de polymère et de **PA**. Le brevet US 4 450 150 appartient à la même famille que le brevet US 4 351 337 étudié
- 35

ci-dessus et a essentiellement le même objet. Les PAA constitutifs sont des poly(acide glutamique-éthylglutamate).

- 5 (e) La demande de brevet PCT WO 97/02810 divulgue une composition pour la libération contrôlée de principes actifs, comprenant une pluralité de particules lamellaires d'un polymère biodégradable, au moins en partie cristallin (polymère d'acide lactique) et d'un PA absorbé sur lesdites particules. Dans ce cas, la libération du principe actif s'opère par désorption.
- 10 (f) La demande de brevet PCT WO 96/29991 a pour objet des particules de polyaminoacides utiles pour la vectorisation de PA dont notamment des PA hydrophiles tels que l'insuline. Ces particules ont une taille comprise entre 10 et 500 nm. Les particules selon le WO 96/29991 se forment spontanément par mise en contact de PAA avec une solution aqueuse. Les PAA comprennent des monomères
- 15 aminoacides neutres et hydrophobes AAO et des monomères ionisables et hydrophiles AAI.
- Ces particules peuvent être chargées en insuline, au mieux à hauteur de 6,5 % en poids sec d'insuline par rapport à la masse de PAA. Le taux de chargement, Ta, est
- 20 mesuré selon un mode opératoire Ma décrit plus loin.
- (g) La demande de brevet EP 0 583 955 (US-B 5 449 513) divulgue des micelles polymère capables de piéger physiquement des PA hydrophobes. Ces micelles sont constituées par des copolymères bloc : PEG/polyAANO, AANO = Amino-Acide
- 25 Neutre hydrophObe. L'AANO peut être : Leu, Val, Phe, Bz-O-Glu, Bz-O-Asp, ce dernier étant préféré. Les principes actifs PA hydrophobes piégés dans ces micelles PEG/polyAANO sont e.g. : Adriamycine, indométhacine, daunomycine, methotrexate, mitomycine.
- 30 (h) Le brevet US N° 5 514 380 divulgue un copolymère comprenant un bloc de polymère d'acide lactique et un bloc de polyoxyde d'éthylène (PEG), utile comme matrice pour la libération de médicaments. Il n'est pas question de microparticules réalisées à partir de ce copolymère.

(i) On connaît par ailleurs de nombreuses publications qui décrivent des particules à base de copolymères PEG/polymère d'acide lactique (PAL), pour la libération prolongée de principes actifs, dont notamment :

- *Biomatériaux* 17 (1996) 1575-1581, Vittaz et al,

- *Polym. Adv. Technol.* 10, 647-654 (1999), Kinn et al.

Dans ces particules copoly(PEG)(PAL), le PA est encapsulé physiquement dans le cœur de PAL par codissolution dans un solvant organique du PA et du copoly(PEG)(PAL). Il en résulte que les PA formés par des protéines pourraient difficilement être encapsulés dans ces particules copoly(PEG)(PAL) car les risques de dénaturation du PA sont importants.

(j) L'article *Biomaterials* 19(1998) 1501-1505 / K.E. GONSALVES *et al* décrit des microparticules (diamètre = 200 nm) de copolymère poly(L-lactique)(Asp) et de copolymère poly(L-lactique)(Ser). Ces particules copoly(PAL)(PAA) - PAA = PolyAminoAcide- sont obtenues sous forme d'émulsion par agitation mécanique d'une solution aqueuse d'Alcool Poly Vinylique (APV) stabilisante (tensioactif) et une solution organique (CH₂Cl₂) de copoly(PAL)(PAA). Ces particules sphériques creuses sont stabilisées grâce au tensioactif APV, qui forme une couche externe, la couche interne étant constituée du copoly(PAL)(PAA). Ces particules nécessitent pour exister l'usage du tensioactif stabilisant APV. Il n'est pas question d'ionisation au moins partielle du PAA. En outre, les auteurs supputent que ces particules copoly (PAL) (PAA) pourraient être utilisées pour la libération contrôlée de médicaments. Cette supputation n'est étayée par aucune expérience technique. Cet article ne divulgue pas de suspension colloïdale stable comprenant ces microparticules, et encore moins une quelconque aptitude de ces dernières à s'associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, avec au moins un principe actif.

Il ressort de ce qui précède que les propositions techniques antérieures sus décrites, satisfont incomplètement aux spécifications du cahier des charges indiqué supra, et, en particulier pour ce qui concerne l'association des particules à des principes actifs (en particulier les protéines) ainsi que l'aptitude de ces particules chargées en PA à libérer ces derniers in vivo sans qu'ils n'aient été altérés par la vectorisation.

Dans cet état de fait, un objectif essentiel est de pouvoir fournir de nouvelles PV qui forment spontanément, et sans l'aide de tensioactifs, des suspensions aqueuses stables

(aux pH physiologiques) de **PV** et adaptées à la vectorisation de **PA** (notamment des **PA** sensibles tels que des protéines).

Un autre objectif essentiel de la présente invention est de fournir de nouvelles **PV**
5 en suspension aqueuse colloïdale stable ou sous forme pulvérulente et à base de poly(aminoacides) (**PAA**), ces nouvelles **PV** se devant de satisfaire au mieux aux spécifications 1 à 9 du cahier des charges susvisé.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension nouvelle de **PV** dont on maîtrise parfaitement les caractéristiques, notamment en termes du taux de
10 chargement en **PA** et en termes de contrôle de cinétique de libération du **PA**.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir des suspensions médicamenteuses injectables. Les spécifications, requises pour de telles suspensions, sont un faible volume d'injection et une faible viscosité. Il importe que la masse de particules colloïdales par dose d'injection soit la plus faible possible et ce sans limiter la quantité du
15 principe actif **PA** transporté par ces particules, afin de ne pas nuire à l'efficacité thérapeutique.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension colloïdale aqueuse ou un solide pulvérulent comprenant des particules de vectorisation de principes actifs satisfaisant aux spécifications visées ci-dessus et qui constitue une forme galénique
20 appropriée et convenable pour une administration, par exemple orale, à l'homme ou l'animal.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de fournir une suspension colloïdale comprenant des particules de vectorisation de principes actifs filtrables sur des filtres de 0,2 μm à des fins de stérilisation.

Un autre objectif essentiel de l'invention est de proposer un procédé de préparation de particules (sèches ou en suspension dans un liquide) de blocs **PAA** hydrophobe/polymère hydrophile utiles, notamment, comme vecteurs de principes actifs (notamment protéines telles que l'insuline, l'IFN, l'IL-2, le facteur VIII, l'EPO, etc), ledit
25 procédé se devant d'être, plus simple à mettre en œuvre, non dénaturant pour les principes actifs et devant en outre toujours permettre une maîtrise fine de la granulométrie moyenne des particules obtenues.

Un autre objectif essentiel de l'invention est l'utilisation des susdites particules en suspension aqueuse ou sous forme solide pour la préparation de médicaments (e.g. vaccins), en particulier pour administration notamment orale, nasale, vaginale,
35 oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale, les principes actifs hydrophiles de ces médicaments pouvant

être, notamment, des protéines, des glycoprotéines, des peptides, des polysaccharides, des lipopolysaccharides, des oligonucléotides et des polynucléotides.

Un autre objectif de la présente invention est de fournir un médicament, du type système à libération prolongée de principes actifs, qui soit aisé et économique à produire et qui soit, en outre, biocompatible et apte à assurer un très haut niveau de biodisponibilité du **PA**.

Les objectifs relatifs aux produits (parmi d'autres) sont atteints par la présente invention qui concerne, tout d'abord, une suspension colloïdale de particules submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de **PA**, ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés, à base d'un copolymère amphiphile comprenant :

- ▶ au moins un bloc de polyaminoacide(s) (**PAA**) linéaire(s), hydrophile(s) à enchaînements α -peptidiques, les aminoacides hydrophiles **AAI** constitutifs de ce bloc **PAA** étant identiques ou différents entre eux ;
- ▶ et au moins un bloc d'au moins un polymère hydrophobe, formé par un Polymère d'Acide α -HydroxyCarboxylique (**PAHC**) – de préférence Polymère d'Acide Lactique (**PAL**) ou Polymère d'Acide Glycolique (**PAG**)-

caractérisée en ce que :

- elle peut être obtenue spontanément en l'absence de tensioactif, par mise en présence de copolymère amphiphile avec un liquide non-solvant des **AAI** ;
- elle est stable même en l'absence de tensioactif ;
- les **AAI** du copolymère sont au moins partiellement sous forme ionisée ;
- les particules sont aptes à s'associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, avec au moins un **PA** et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée.

L'un des fondements inventifs de ces nouvelles particules de vectorisation **PV**, en suspension aqueuse colloïdale stable aux pH physiologiques ou à l'état de solide pulvérulent, tient à la sélection originale d'un copolymère bloc (polymère d'acide(s) α -hydroxycarboxylique(s) hydrophobe) / (polyaminoacide hydrophile) permettant d'obtenir des particules de taille submicronique, qui forment une suspension colloïdale (de préférence aqueuse) stable à tous pH physiologiques, en l'absence de tensioactifs qui soient adaptés à tous pH.

Le fait que ces microparticules (**PAHC**)(**PAA**) aient au moins une partie de leurs **AAI** sous forme ionisée en suspension, constitue également une caractéristique innovante.

Un autre avantage remarquable de ces particules submicroniques tient à leur capacité à permettre l'adsorption à leur surface de **PA**, en suspension colloïdale à l'état non dissous, et donc en l'absence de tout solvant organique ou tensioactif agressif. Ce type d'association est à distinguer des processus d'encapsulation physique de **PA** en solution, dans des cœurs de microparticules. De telles conditions d'encapsulation sont dénaturantes pour certains **PA**. Il n'en est rien s'agissant des microparticules selon l'invention.

En outre, il est particulièrement surprenant et inattendu que les particules à base de copolymère bloc amphiphile *poly(AAI)/(polylactide et/ou glycolide et/ou caprolactone)*, puissent s'associer et libérer in vivo des **PA**, en particulier des protéines.

La structure des copolymères bloc PAHC/PolyAAI et la nature des acides aminés AAI, sont choisies de telle façon que :

- les chaînes de polymères se structurent spontanément sous forme de particules (**PV**) de petite taille;
- les particules forment une suspension colloïdale stable dans l'eau et en milieu physiologique (pH=6-8) ;
- les **PV** s'associent à l'état colloïdal non dissous avec des protéines ou autres **PA** en milieu aqueux, par un mécanisme spontané et non dénaturant pour le **PA** ;
- les **PV** libèrent les **PA** en milieu physiologique et, plus précisément, in vivo ; la cinétique de libération est fonction de la nature du copolymère PAHC/PolyAAI précurseur des **PV**.

Ainsi, en jouant sur la structure particulière du copolymère, on peut contrôler les phénomènes d'association et de libération du **PA** sur le plan cinétique et quantitatif.

De préférence, la suspension est caractérisée en ce qu'elle est obtenue par mise en solution du copolymère amphiphile dans un solvant organique et mis en présence de cette solution avec un liquide aqueux.

Pour définir un peu plus les copolymères constitutifs des particules, on peut indiquer qu'ils sont du type séquentiel alterné (blocs).

Ainsi, selon une forme préférée de réalisation des **PV** selon l'invention :

- les AAI sont des acides aminés hydrophiles AAI ;
- le rapport AHC/AAI est supérieur à 0,1 ;
- la longueur absolue du bloc PAHC est supérieure à 2 monomères, de préférence supérieure à 10 monomères; et plus préférentiellement comprise entre 20 et 100 monomères.

Dans la présente demande, on entend par AHC, un monomère constitutif du PAHC.

Avantageusement, le ou les blocs PAA à base d'AAI en comprennent au moins 5,
5 de préférence au moins 20, et plus préférentiellement encore au moins entre 30 et 100.

De manière plus préférée encore, les particules sont des "diblocs" de PAHC/AAI.

Le ou les AAI est(sont) choisi(s) parmi des aminoacides à chaîne latérale ionisable,
10 les aminoacides naturels Glu et Asp sous forme carboxylique et/ou sous forme de sels
étant particulièrement préférés.

Les PAA blocs constitutifs de particules ont, par exemple, des degrés de
polymérisation DP compris entre 30 et 600, de préférence entre 50 et 200 et, plus
15 préférentiellement encore, entre 60 et 150.

La présente invention vise, non seulement des suspensions de particules nues, telles
que définies ci-dessus, mais également des particules comprenant au moins un principe
actif **PA** de préférence, la suspension selon l'invention est aqueuse et stable. Ces
20 particules, chargées ou non en **PA**, sont, avantageusement, sous forme dispersée dans un
liquide (suspension), de préférence aqueux, mais peuvent également être à l'état de solide
pulvérulent, obtenu à partir de la suspension de **PV** telle que définie ci-dessus.

D'où il s'ensuit que l'invention concerne, outre une suspension colloïdale (de
25 préférence aqueuse) de **PV**, un solide pulvérulent comprenant des **PV** et obtenu à partir de
la suspension selon l'invention.

Un autre objet essentiel de l'invention se rapporte à la préparation des particules
sélectionnées (telles que décrites ci-avant), aussi bien sous forme de suspension colloïdale
30 que sous forme de solide pulvérulent. Le procédé de préparation considéré consiste,
essentiellement, à synthétiser des copolymères PAHC/polyAAI précurseur et à les
transformer en particules structurées.

Plus précisément, il s'agit, tout d'abord, d'un procédé de préparation du solide
35 pulvérulent susvisé et formé par des particules submicroniques susceptibles d'être

utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s) (PA), ces particules étant des arrangements supramoléculaires individualisés :

- à base d'un copolymère amphiphile comprenant :
 - ✓ au moins un bloc de polyaminoacide(s) (PAA) linéaire(s), hydrophile(s) à enchaînements α -peptidiques, les aminoacides hydrophiles AAI constitutifs de ce bloc PAA étant identiques ou différents entre eux ;
 - ✓ et au moins un bloc de polymère(s) hydrophobe(s) à base de Polymère(s) d'Acide(s) α -HydroxyCarboxylique(s) (PAHC) – de préférence Polymère(s) d'Acide Lactique(PAL)ou Polymère(s) d'Acide Glycolique (PAG) - ;
- aptes à former une suspension colloïdale, même en l'absence de tensioactifs ;
- aptes à s'associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, avec au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière prolongée et/ou retardée.

Ce procédé est caractérisé en ce que :

- 1)- on met en œuvre ou on prépare par polymérisation de monomères d'acide(s) α -hydroxycarboxylique(s)-de préférence acide lactique ou glycolique- au moins un bloc polymère PAHC (de préférence de PAL ou PAG); ce bloc PAHC étant fonctionnalisé (avantageusement à au moins l'une de ses extrémités) par au moins un groupement réactif protecteur, de préférence choisi dans le groupe comprenant la BOC-éthanolamine, BOC-aminopropanol, (BOC = ButOxyCarbonyle) ;
- 2)- on déprotège le bloc polymère PAHC de l'étape -1)- ;
- 3)- on réalise une copolymérisation de monomères formés par des anhydrides de N-CarboxyAminoacides (NCA) d'amino-acides hydrophiles AAI et/ou par des anhydrides de N-CarboxyAminoacides (NCA) précurseurs d'amino-acides hydrophiles AAI et porteurs de groupements protecteurs, en présence d'au moins un solvant organique, de préférence choisi dans le groupe comprenant : la N-MéthylPyrrolidone (NMP), le DiMéthylFormamide (DMF), le DiMéthylsulfOxyde (DMSO), le DiMéthylAcétamide (DMAc), la pyrrolidone et le dichlorométhane ; ce dernier étant plus particulièrement préféré ;

- 4)- on ajoute le bloc polymère PAHC déprotégé de l'étape -2)- au milieu de polymérisation du bloc de poly-AAI, avant, pendant ou après la polymérisation;
- 5 -5)- éventuellement on déprotège les précurseurs d'amino-acides hydrophiles AAI pour obtenir un ou plusieurs blocs polyAAI ;
- 6)- on précipite le copolymère bloc PAHC-polyAAI obtenu à l'issue des étapes précédentes ;
- 10 -7)- on met en solution le précipité de copolymère bloc PAHC-polyAAI obtenu à l'étape -6)- et on met en présence cette solution avec un liquide contenant au moins un non-solvant du copolymère bloc PAHC-polyAAI, de préférence l'eau, ce liquide ayant un pH choisi de telle sorte que les AAI du copolymère
- 15 bloc PAHC-polyAAI soient au moins en partie ionisés ;
- 8)- éventuellement on associe au moins un principe actif **PA** hydrophile avec les particules ;
- 20 -9)- éventuellement on purifie la suspension de l'étape -7)- ;
- 10)- éventuellement on concentre la suspension de l'étape -7)- ;
- 11)- on élimine le milieu liquide pour recueillir le solide pulvérulent comprenant
- 25 les particules.

Avantageusement, les PAHC de l'étape -1)- sont obtenus de manière connue en soi par polymérisation de lactide, de glycolide, ou de caprolactone, ou bien encore sont des produits commerciaux disponibles (polylactide, polylactide/glycolide, polycaprolactone e.g.).

30

Des procédés d'obtention de ces PAHC sont décrits par exemple dans les brevets suivants : US 4 835 293, US 5 023 349, FR 2 692 263.

35 La déprotection selon l'étape -2)- s'effectue de manière connue en soi, par exemple par hydrolyse acide (e.g. acide trifluoroacétique).

La troisième étape du procédé s'inspire des techniques connues de polymérisation d'anhydrides de N-carboxy-(-aminoacides (NCA), décrites, par exemple, dans l'article « Biopolymers, 15, 1869 (1976) » et dans l'ouvrage de H.R. KRICHELDORF " (-Aminoacid-N-carboxy Anhydride and Related Heterocycles » Springer Verlag (1987)".

5

De préférence, le ou les bloc(s) PAHC fonctionnalisé(s) est (sont) introduit(s) avant et/ou au début de la polymérisation selon l'étape -3)-, qui se déroule de préférence à une température comprise entre 20 et 120°C à pression atmosphérique normale.

10 Avantageusement, cette étape -3)- est réalisée en présence d'au moins un co-solvant sélectionné parmi les solvants aprotiques (de préférence le dioxanne-1,4) et/ou les solvants protiques (de préférence la pyrrolidone) et/ou l'eau et/ou les alcools, le méthanol étant particulièrement préféré.

15 De manière plus préférée encore, les NCA-AAI sont des NCA d'acide glutamique ou aspartique O-alkylé ou O-arylé, par exemple des NCA-Glu-O-Me, NCA-Glu-O-Et ou NCA-Glu-O-Bz (Me = méthyle / Et = éthyle / Bz = benzyle).

D'autres paramètres expérimentaux, comme :

- 20 ○ la concentration en NCA et/ou en polymère bloc PAHC dans le solvant organique (de préférence le dichlorométhane) ;
- et/ou la concentration ou la nature de l'éventuel cosolvant, lors de la synthèse ;
- la température du mélange réactionnel ;
- 25 ○ le mode d'ajout du polymère hydrophile ;
- l'emploi de pression réduite ;
- la durée de la réaction, etc... ;

sont ajustés selon les effets désirés et bien connus de l'homme de l'art.

30 Suivant une variante dans laquelle le procédé est interrompu à l'issue d'une étape -5bis)- succédant à l'issue de l'étape -5)-, on précipite – de préférence dans l'eau – le copolymère PAHC-polyAAI obtenu et on recueille ce précipité. Cette variante correspond à un mode discontinu de préparation de particules, dans lequel on isole le copolymère PAHC-polyAAI sous forme de précipité formant un produit intermédiaire stable. Ce

35 précipité peut être, par exemple, filtré, lavé et séché.

Pour effectuer l'association de l'étape -8)- d'un ou plusieurs **PA** aux particules, il est possible de mettre en œuvre plusieurs méthodes conformément à l'invention.

Des exemples, non limitatifs, de ces méthodes sont énumérés ci-après.

5

Selon une première méthode, on effectue l'association de **PA** aux particules par mise en présence d'une phase liquide (aqueuse ou non) contenant le **PA** avec la suspension colloïdale de particules.

10

Selon une deuxième méthode, on effectue l'association du **PA** aux particules par mise en présence d'un **PA** à l'état solide avec la suspension colloïdale de particules. Le **PA** solide peut être, par exemple, sous forme de lyophilisat, de précipité, de poudre ou autre.

15

Selon une troisième méthode, on met en présence le solide pulvérulent (polylactide/polyAAI), tel que décrit supra en tant que produit et par ses caractéristiques d'obtention, avec une phase liquide (aqueuse ou non) contenant le **PA**.

20

Selon une quatrième méthode, on met en présence le solide pulvérulent, tel que décrit supra en tant que produit et par ses caractéristiques d'obtention, avec le **PA** sous forme solide. On disperse ensuite ce mélange de solides, dans une phase liquide, de préférence une solution aqueuse.

25

Dans toutes ces méthodes, le **PA** utilisé peut être sous forme pure ou préformulée.

Conformément à l'étape facultative -9)-, on élimine les impuretés (sels) ainsi que le solvant, par tout traitement de séparation physique approprié, par exemple par diafiltration (dialyse), filtration, modification pH, chromatographie...

30

Cela conduit à une suspension (de préférence aqueuse) de particules structurées qui peut être concentrée [étape -10)-], par exemple par distillation ou tout autre moyen physique convenable : ultrafiltration, centrifugation.

35

Pour séparer à l'étape -11)-, les particules de leur milieu liquide de suspension, on élimine, éventuellement, la phase aqueuse, par exemple par séchage (e.g. à l'étuve), par lyophilisation ou tout autre moyen physique convenable : ultrafiltration, centrifugation. On récupère, à l'issue de cette étape -11)-, un solide pulvérulent, de couleur blanche.

Il est à noter que la mise en œuvre des étapes -1)-, -2)-, -3)-, -4)-, -5)-, -6)-, -7)-, et éventuellement -8)- du procédé ci-dessus correspondent à une préparation d'une suspension colloïdale de particules submicroniques et à fort taux de chargement en **PA**.

5 Lors de cette préparation de suspension colloïdale, les copolymères amphiphiles polylactide et/ou polyglycolide et/ou polycaprolactone-poly(AAI) de l'étape -6)- sont placés dans un milieu aqueux dans lequel au moins une partie des PAHC est soluble et au moins une partie des AANO est insoluble. Les copolymères PAHC/polyAAI existent sous forme de nanoparticules dans ce milieu aqueux.

10 Une alternative pour préparer la suspension de **PV** selon l'invention consiste à mettre en présence le solide pulvérulent, tel que décrit ci-dessus en tant que produit et par son procédé d'obtention, avec un milieu aqueux, non-solvant des AAI.

15 Compte tenu de la taille nanométrique des particules, la suspension peut être filtrée sur des filtres de stérilisation, ce qui permet d'obtenir, aisément et à moindre coût, des liquides médicamenteux injectables stériles. Le fait de pouvoir, grâce à l'invention, faire subir à la suspension de particules une filtration stérilisante, est un atout important.

20 La présente invention vise, également, de nouveaux produits intermédiaires du procédé décrit ci-dessus, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des copolymères PAHC-polyAAI précurseurs de particules.

25 Selon un autre de ses aspects, l'invention concerne une suspension et/ou un solide pulvérulent, tels que définis ci-dessus et/ou tels qu'obtenus par le procédé présenté supra, cette suspension et ce solide comprenant au moins un principe actif hydrophile, choisi, de préférence, parmi :

- les vaccins ;
- les protéines et/ou les peptides, parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes, les albumines, les interférons, les cytokines, les antigènes, les anticorps, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les interleukines ou leurs mélanges, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse ;
- 30 • les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée ;
- les acides nucléiques et, préférentiellement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN,

- des molécules non peptido-protéiques appartenant à diverses classes de chimiothérapie anticancéreuses et, en particulier, les anthracyclines et les taxoïdes ;
- et leurs mélanges.

5

Enfin, l'invention concerne une spécialité pharmaceutique, nutritionnelle, phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comporte une suspension et/ou du solide pulvérulent chargé(s) en **PA** hydrophile et tels que définis ci-dessus.

10

Selon un autre de ses objets, l'invention vise, également, l'utilisation de ces **PV** (en suspension ou sous forme solide) chargées en **PA**, pour la fabrication de médicaments du type systèmes à libération contrôlée de **PA**.

15

Il peut s'agir, par exemple de ceux administrables, de préférence par voie orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale.

20

Les applications cosmétiques envisageables sont, par exemple, les compositions comprenant un **PA** associé aux **PV** selon l'invention et applicables par voie transdermique.

25

Enfin, l'invention concerne une spécialité pharmaceutique, nutritionnelle, phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comporte une suspension et/ou du solide pulvérulent chargé(s) en **PA** et tels que définis ci-dessus.

30

Selon un autre de ses objets, l'invention vise, également, l'utilisation de ces **PV** (en suspension ou sous forme solide) chargées en **PA**, pour la fabrication de médicaments du type systèmes à libération contrôlée de **PA**.

Dans le cas de médicaments, il peut s'agir, par exemple de ceux administrables, de préférence par voie orale, nasale, vaginale, oculaire, sous-cutanée, intraveineuse, intramusculaire, intradermique, intrapéritonéale, intracérébrale ou parentérale.

Les applications cosmétiques envisageables sont, par exemple, les compositions comprenant un **PA** associé aux **PV** selon l'invention et applicables par voie transdermique.

- 5 Les produits phytosanitaires concernés peuvent être, par exemple, des herbicides, des pesticides, des insecticides, des fongicides, etc...

Les exemples qui suivent permettront de mieux comprendre l'invention dans ses différents aspects produit/procédé/application. Ces exemples illustrent la préparation de
10 particules de polylactide/PAAI chargés ou non en principes actifs, de même qu'ils présentent les caractéristiques de structure et les propriétés de ces particules.

DESCRIPTION DES FIGURES

15

Figure 1 :

Isotherme d'adsorption de l'insuline (9, 3mg/ml) sur la dispersion de nanoparticules de l'exemple 8.

20 **Figure 2 :**

Profils d'insulinémie et de glycémie chez le cochon sain après administration d'une dose de 0,6 IU/kg d'insuline adsorbée sur les particules de l'exemple 7.

25 **EXEMPLES :**

La synthèse des copolymères blocs se déroule en quatre grandes étapes :

1. polymérisation du lactide avec un amorceur bifonctionnel protégé ;
2. déprotection de l'amorceur lié au polymère;
- 30 3. polymérisation du second monomère sur la fonction déprotégée de l'amorceur ;
4. déprotection des groupements protecteurs sur le second monomère.

Exemple 1 : poly(acide lactique)₂₀-bloc-(acide glutamique)₅₀

1.1 BOC-aminopropyl-poly(acide lactique)₂₀ : L-lactide (5 g, 34,70 mmol, Aldrich 16101-127) et toluène distillé (27ml) sont introduits dans un ballon sec et sous azote. On chauffe une heure à 80°C. Dans un second ballon on prépare un mélange de t-butoxycarbonyl-aminopropanol (0,58 g, 3,30 mmol, Fluka 381029/1) et de toluène fraîchement distillé (23ml), qui est refroidi à -10°C. Après l'ajout du diéthylzinc (1,5 ml, 1,65 mmol, 1,1 M dans le toluène, Aldrich 72560-099) au BOC-aminopropanol, on permet à ce que cette réaction revient à température ambiante, puis on l'ajoute sur le monomère lactide pour initier la polymérisation. La polymérisation est terminée par un ajout de 4ml d'acide acétique en solution dans le toluène (10 %). Le milieu réactionnel est alors concentré à l'évaporateur rotatif et précipité dans un large excès de méthanol. Le polymère est récupéré par filtration puis séché sous vide. Rendement : 98 %. *Caractérisations* : Tg : 30-37°C. RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 1,4 ppm (s, 9H, CCH₃), 1,55 ppm (d, 6H, ³J=7,1Hz, CHCH₃), 1,85 ppm (q, 2H, ³J=6,3Hz, CH₂CH₂CH₂), 3,1 ppm (q, 2H, ³J=6,2Hz, CH₂NH), 4,15 ppm (t, 2H, ³J=6,0Hz, CH₂O), 4,35 ppm (q, 1H, ³J=6,9Hz, CH₃CHOH), 4,8 ppm (m, 1H, NH), 5,15 ppm (q, 2H, ³J=7,1Hz, CHCH₃). RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 17 ppm (2C, CHCH₃), 20,7 ppm (1C, CH₃CHOH), 28,7 ppm (3C, CH₃C), 29,5 ppm (CH₂CH₂CH₂), 37,5 ppm (CH₂NH), 63,5 ppm (CH₂O), 67 ppm (CH₃CHOH), 69,5 ppm (2C, CH), 156 ppm (NHC=O), 170 ppm (CHC(O)O).

1.2 aminopropyl-poly(acide lactique)₂₀: Du polylactide (4g, 2,65mmol) et le dichlorométhane distillé (45ml) sont introduits sous courant d'azote dans un ballon. On introduit l'acide trifluoroacétique (8ml, 0,1mol, Sigma 19H3648) et on place la solution sous agitation à température ambiante pendant une demi-heure, jusqu'à ce que le dégagement de CO₂ soit terminé. On évapore les solvants du milieu réactionnel à l'évaporateur rotatif. On ajoute 40ml de dichlorométhane et la solution est lavée deux fois par 40ml de NaHCO₃ en solution aqueuse (5%) puis deux fois par 40ml d'eau distillée jusqu'à ce que le pH des eaux de lavage soit neutre. La phase organique est séchée sur MgSO₄ puis filtrée. Le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif, puis le polymère est séché sous vide. Rendement : 95%. *Caractérisations* : RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 1,55 ppm (d, 6H, ³J=7,1Hz, CH₃), 1,85 ppm (q, 2H, ³J=6,3Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,8 ppm (q, 2H, ³J=6,2Hz, CH₂NH₂), 4,15 ppm (t, 2H, ³J=6,0Hz, CH₂O), 4,35 ppm (q, 1H, ³J=6,9Hz, CH₃CHOH), 5,15 ppm (q, 2H, ³J=7,1Hz, CH).

- 1.3 **poly(benzyl glutamate)₅₀-propyl-poly(acide lactique)₂₀**: Du N-carboxyanhydride de L-glutamate de benzyle (8,68g, 33,0 mmol) est introduit dans un ballon. Le polylactide déprotégé (1g, 0,66 mmol) est solubilisé dans du dichlorométhane fraîchement distillé (40ml) puis introduit par canule. Le milieu réactionnel est placé sous agitation magnétique pendant trois heures à température ambiante. Le solvant est évaporé au rotavapor puis le polymère est séché sous vide primaire. Rendement: 85%. *Caractérisations* : RMN ¹H (TFA d) : δ = 1,55 ppm (m, 6H, CH₃), 1,95 ppm (m, 2H, CH₂CH₂C=O), 2,35 ppm (m, 2H, CH₂CH₂C=O), 4,60 ppm (m, 1H, O=CCHNH), 5,0ppm (m, 2H, CH), 5,25 ppm (m, 2H, CH₂Ph), 7,10 ppm (m, 5H, Ph). RMN ¹³C (DMSO d₆) : δ = 17 ppm (CH₃), 27 ppm (CH₂CH₂COO), 30 ppm (CH₂CH₂COO), 52 ppm (O=CCHNH), 66 ppm (CH₂Ph), 128-136 ppm (Ph), 168-170 ppm (OC=O), 172 ppm (NC=O).
- 1.4 **poly(acide glutamique)₅₀-propyl-poly(acide lactique)₂₀**: Le copolymère (5g, 20mmol d'ester de benzyle) est introduit dans un ballon et solubilisé dans l'acide trifluoroacétique (44ml, 0,57mol) à 10°C. On introduit l'acide méthane sulfonique (44ml, 0,68mol) et l'anisole (11ml, 0,10mol) sous courant d'azote et on laisse le milieu réactionnel trois heures sous agitation. Le polymère est précipité dans un large excès d'éther éthylique froid, récupéré par filtration, lavé avec de l'éther éthylique et séché sous vide. Rendement : 99%. *Caractérisations* : RMN ¹H (TFA d) : δ = 1,55 ppm (m, 6H, CH₃), 1,95 ppm (m, 2H, CH₂CH₂C=O), 2,35 ppm (m, 2H, CH₂CH₂C=O), 4,60 ppm (m, 1H, O=CCHNH), 5,0ppm (m, 2H, CH). RMN ¹³C (DMSO d₆) : δ = 17 ppm (CH₃), 27 ppm (CH₂CH₂COOH), 30 ppm (CH₂CH₂COOH), 52 ppm (OCCHNH), 69 ppm (CH), 168-170 ppm (O=CO), 172 ppm (O=CNH).

Exemple 2 : poly(acide lactique)₃₀-bloc-(acide glutamique)₈₀

- 2.1 **BOC-aminopropyl-poly(acide lactique)₃₀** : Le L-lactide (5g, 34,70mmol, Aldrich 16101-127) est introduit en boîte à gants sous atmosphère d'azote dans un ballon préalablement flammé. Le toluène, fraîchement distillé (27ml) est introduit par canule dans le ballon que l'on place sous agitation magnétique pendant une heure à 80°C. Le ter-butoxycarbonyl aminopropanol (0,40g, 2,30mmol, Fluka 381029/1) et le toluène fraîchement distillé (23ml) sont introduits dans un ballon préalablement flammé et placé sous agitation magnétique dans un bain à -10°C. La solution de

diéthylzinc dans le toluène (1,0ml, 1,15mmol, 1,1M, Aldrich 72560-099) est introduite goutte-à-goutte dans cette solution. Le milieu réactionnel est alors laissé sous agitation magnétique à température ambiante. Au bout d'une heure on introduit la solution de L-lactide sous courant d'azote dans le milieu réactionnel que l'on place alors à 80°C sous agitation pendant une heure. La polymérisation est terminée par un ajout de 4ml d'acide acétique en solution dans le toluène (10%). Le milieu réactionnel est alors concentré à l'évaporateur rotatif et précipité dans un large excès de méthanol froid. Le polymère précipité est récupéré par filtration puis séché sous vide primaire. Rendement : 98%. *Caractérisations* : Tg : 30-37°C. RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 1,4 ppm (s, 9H, CCH₃), 1,55 ppm (d, 6H, ³J=7,1Hz, CHCH₃), 1,85 ppm (q, 2H, ³J=6,3Hz, CH₂CH₂CH₂), 3,1 ppm (q, 2H, ³J=6,2Hz, CH₂NH), 4,15 ppm (t, 2H, ³J=6,0Hz, CH₂O), 4,35 ppm (q, 1H, ³J=6,9Hz, CH₃CHOH), 4,8 ppm (m, 1H, NH), 5,15 ppm (q, 2H, ³J=7,1Hz, CHCH₃). RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 17 ppm (2C, CHCH₃), 20,7 ppm (1C, CH₃CHOH), 28,7 ppm (3C, CH₃C), 29,5 ppm (CH₂CH₂CH₂), 37,5 ppm (CH₂NH), 63,5 ppm (CH₂O), 67 ppm (CH₃CHOH), 69,5 ppm (2C, CH), 156 ppm (NHC=O), 170 ppm (CHC(O)O).

2.2 aminopropyl-poly(acide lactique)₃₀ : Le polylactide (4g, 1,85mmol) et le dichlorométhane fraîchement distillé (45ml) sont introduits sous courant d'azote dans un ballon préalablement flammé et relié à un bulleur. On introduit l'acide trifluoroacétique (8ml, 0,1mol, Sigma 19H3648) et on place la solution sous agitation à température ambiante pendant une demi-heure, jusqu'à ce que le dégagement de CO₂ soit terminé. On évapore les solvants du milieu réactionnel à l'évaporateur rotatif. On solubilise le polylactide dans 40ml de dichlorométhane. Cette phase organique est lavée deux fois par 40ml de NaHCO₃ en solution aqueuse (5%) puis deux fois par 40ml d'eau distillée jusqu'à ce que le pH des eaux de lavage soit neutre. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ puis filtrée. Le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif, puis le polymère est séché sous vide primaire. Rendement : 95%. *Caractérisations* : RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 1,55 ppm (d, 6H, ³J=7,1Hz, CH₃), 1,85 ppm (q, 2H, ³J=6,3Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,8 ppm (q, 2H, ³J=6,2Hz, CH₂NH₂), 4,15 ppm (t, 2H, ³J=6,0Hz, CH₂O), 4,35 ppm (q, 1H, ³J=6,9Hz, CH₃CHOH), 5,15 ppm (q, 2H, ³J=7,1Hz, CH).

2.3 poly(benzyl glutamate)₈₀-propyl-poly(acide lactique)₃₀ : Du N-carboxyanhydride de L-glutamate de benzyle (9,74g, 37,0mmol) fourni par Flamel Technologies est pesé et introduit en boîte à gants sous atmosphère d'azote dans un ballon

préalablement flammé. Le polylactide déprotégé (1g, 0,46mmol) est solubilisé dans du dichlorométhane fraîchement distillé (45ml) puis introduit par canule. Le milieu réactionnel est placé sous agitation magnétique pendant trois heures à température ambiante. Le solvant est évaporé au rotavapor puis le polymère est séché sous vide
 5 primaire. Rendement : 85%. *Caractérisations* : RMN ^1H (TFA d) : δ = 1,55 ppm (m, 6H, CH_3), 1,95 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2,35 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 4,60 ppm (m, 1H, $\text{O}=\text{CCHNH}$), 5,0ppm (m, 2H, CH), 5,25 ppm (m, 2H, CH_2Ph), 7,10 ppm (m, 5H, Ph). RMN ^{13}C (DMSO d_6) : δ = 17 ppm (CH_3), 27 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 30 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 52 ppm ($\text{O}=\text{CCHNH}$), 66 ppm (CH_2Ph),
 10 128-136 ppm (Ph), 168-170 ppm ($\text{OC}=\text{O}$), 172 ppm ($\text{NC}=\text{O}$).

2.4 poly(acide glutamique)₈₀-propyl-poly(acide lactique)₃₀ : Le copolymère (5g, 20,3mmol d'ester de benzyle) est introduit sous courant d'azote dans un ballon préalablement flammé. Il est solubilisé dans l'acide trifluoroacétique (44ml, 0,57mol). La solution est alors placée sous agitation à 10°C. On introduit l'acide méthane sulfonique (44ml, 0,68mol) et l'anisole (11ml, 0,10mol) sous courant d'azote. On laisse le milieu réactionnel trois heures sous agitation à 10°C, puis on le précipite dans un large excès d'éther éthylique froid. Le polymère précipité est récupéré par filtration, lavé avec de l'éther éthylique et séché sous vide primaire.
 15 Rendement : 99%. *Caractérisations* : RMN ^1H (TFA d) : δ = 1,55 ppm (m, 6H, CH_3), 1,95 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2,35 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 4,60 ppm (m, 1H, $\text{O}=\text{CCHNH}$), 5,0ppm (m, 2H, CH). RMN ^{13}C (DMSO d_6) : δ = 17 ppm (CH_3), 27 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 30 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 52 ppm (OCCHNH), 69 ppm (CH), 168-170 ppm ($\text{O}=\text{CO}$), 172 ppm ($\text{O}=\text{CNH}$).
 20
 25

Exemple 3 : poly(acide lactique)₅₀-bloc-(acide glutamique)₅₀

3.1 BOC-aminopropyl-poly(acide lactique)₅₀ : Le L-lactide (5g, 34,70mmol, Aldrich 16101-127) est pesé et introduit en boîte à gants sous atmosphère d'azote dans un ballon préalablement flammé. Le toluène, fraîchement distillé (27ml) est introduit par canule dans le ballon que l'on place sous agitation magnétique pendant une heure à 80°C. Le ter-butoxycarbonyl aminopropanol (0,24g, 1,38mmol, Fluka 381029/1) et le toluène fraîchement distillé (23ml) sont introduits dans un ballon
 30 préalablement flammé et placé sous agitation magnétique dans un bain à -10°C. La solution de diéthylzinc dans le toluène (0,63ml, 0,69mmol, 1,1M, Aldrich 72560-
 35

099) est introduite goutte-à-goutte dans cette solution. Le milieu réactionnel est alors laissé sous agitation magnétique à température ambiante. Au bout d'une heure on introduit la solution de L-lactide sous courant d'azote dans le milieu réactionnel que l'on place alors à 80°C sous agitation pendant une heure. La polymérisation est terminée par un ajout de 4ml d'acide acétique en solution dans le toluène (10%). Le milieu réactionnel est alors concentré à l'évaporateur rotatif et précipité dans un large excès de méthanol froid. Le polymère précipité est récupéré par filtration puis séché sous vide primaire. Rendement : 98%. *Caractérisations* : Tg : 30-37°C. RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 1,4 ppm (s, 9H, CCH₃), 1,55 ppm (d, 6H, ³J=7,1Hz, CHCH₃), 1,85 ppm (q, 2H, ³J=6,3Hz, CH₂CH₂CH₂), 3,1 ppm (q, 2H, ³J=6,2Hz, CH₂NH), 4,15 ppm (t, 2H, ³J=6,0Hz, CH₂O), 4,35 ppm (q, 1H, ³J=6,9Hz, CH₃CHOH), 4,8 ppm (m, 1H, NH), 5,15 ppm (q, 2H, ³J=7,1Hz, CHCH₃). RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 17 ppm (2C, CHCH₃), 20,7 ppm (1C, CH₃CHOH), 28,7 ppm (3C, CH₃C), 29,5 ppm (CH₂CH₂CH₂), 37,5 ppm (CH₂NH), 63,5 ppm (CH₂O), 67 ppm (CH₃CHOH), 69,5 ppm (2C, CH), 156 ppm (NHC=O), 170 ppm (CHC(O)O).

3.2 aminopropyl-poly(acide lactique)₅₀ : Le polylactide (4g, 1,11mmol) et le dichlorométhane fraîchement distillé (45ml) sont introduits sous courant d'azote dans un ballon préalablement flammé et relié à un bulleur. On introduit l'acide trifluoroacétique (8ml, 0,1mol, Sigma 19H3648) et on place la solution sous agitation à température ambiante pendant une demi-heure, jusqu'à ce que le dégagement de CO₂ soit terminé. On évapore les solvants du milieu réactionnel à l'évaporateur rotatif. On solubilise le polylactide dans 40ml de dichlorométhane. Cette phase organique est lavée deux fois par 40ml de NaHCO₃ en solution aqueuse (5%) puis deux fois par 40ml d'eau distillée jusqu'à ce que le pH des eaux de lavage soit neutre. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ puis filtrée. Le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif, puis le polymère est séché sous vide primaire. Rendement : 95%. *Caractérisations* : RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 1,55 ppm (d, 6H, ³J=7,1Hz, CH₃), 1,85 ppm (q, 2H, ³J=6,3Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,8 ppm (q, 2H, ³J=6,2Hz, CH₂NH₂), 4,15 ppm (t, 2H, ³J=6,0Hz, CH₂O), 4,35 ppm (q, 1H, ³J=6,9Hz, CH₃CHOH), 5,15 ppm (q, 2H, ³J=7,1Hz, CH).

3.3 poly(benzyl glutamate)₅₀-propyl-poly(acide lactique)₅₀ : Du N-carboxyanhydride de L-glutamate de benzyle (3,65g, 13,8mmol) est pesé et introduit en boîte à gants sous atmosphère d'azote dans un ballon préalablement flammé. Le polylactide déprotégé (1g, 0,27mmol) est solubilisé dans du dichlorométhane fraîchement

distillé (17ml) puis introduit par canule. Le milieu réactionnel est placé sous agitation magnétique pendant trois heures à température ambiante. Le solvant est évaporé au rotavapor puis le polymère est séché sous vide primaire. Rendement : 85%. *Caractérisations* : RMN ^1H (TFA d) : δ = 1,55 ppm (m, 6H, CH_3), 1,95 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2,35 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 4,60 ppm (m, 1H, $\text{O}=\text{CCHNH}$), 5,0ppm (m, 2H, CH), 5,25 ppm (m, 2H, CH_2Ph), 7,10 ppm (m, 5H, Ph). RMN ^{13}C (DMSO d6) : δ = 17 ppm (CH_3), 27 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 30 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 52 ppm ($\text{O}=\text{CCHNH}$), 66 ppm (CH_2Ph), 128-136 ppm (Ph), 168-170 ppm ($\text{OC}=\text{O}$), 172 ppm ($\text{NC}=\text{O}$).

3.4 poly(acide glutamique)₅₀-propyl-poly(acide lactique)₅₀ : Le copolymère (3g, 10,27mmol d'ester de benzyle) est introduit sous courant d'azote dans un ballon préalablement flammé. Il est solubilisé dans l'acide trifluoroacétique ((22,5ml, 0,29mol). La solution est alors placée sous agitation à 10°C. On introduit l'acide méthane sulfonique (22,5ml, 0,35mol) et l'anisole (5,5ml, 0,05mol) sous courant d'azote. On laisse le milieu réactionnel trois heures sous agitation à 10°C, puis on le précipite dans un large excès d'éther éthylique froid. Le polymère précipité est récupéré par filtration, lavé avec de l'éther éthylique et séché sous vide primaire. Rendement : 99%. *Caractérisations* : RMN ^1H (TFA d) : δ = 1,55 ppm (m, 6H, CH_3), 1,95 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2,35 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 4,60 ppm (m, 1H, $\text{O}=\text{CCHNH}$), 5,0ppm (m, 2H, CH). RMN ^{13}C (DMSO d6) : δ = 17 ppm (CH_3), 27 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 30 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 52 ppm (OCCHNH), 69 ppm (CH), 168-170 ppm ($\text{O}=\text{CO}$), 172 ppm ($\text{O}=\text{CNH}$).

Exemple 4 : poly(acide lactique)₈₀-bloc-(acide glutamique)₂₀

4.1 BOC-aminopropyl-poly(acide lactique)₈₀ : L-lactide (5,2g, 36,09mmol, Aldrich 16101-127) et toluène distillé (27ml) sont introduits dans un ballon sec et sous azote. On chauffe une heure à 80°C. Dans un second ballon on prépare un mélange de t-butoxycarbonyl aminopropanol (0,16g, 0,91mmol, Fluka 381029/1) et de toluène fraîchement distillé (23ml), qui est refroidi à -10°C. Après l'ajout du diéthylzinc (0,4ml, 0,44mmol, 1,1M dans le toluène, Aldrich 72560-099) au BOC-aminopropano, on permet à ce que cette réaction revient à température ambiante, puis on l'ajout sur le monomère lactide pour initier la polymérisation. La polymérisation est terminée par un ajout de 0,5ml d'acide acétique en solution

dans le toluène (10%). Le milieu réactionnel est alors concentré à l'évaporateur rotatif et précipité dans un large excès de méthanol. Le polymère est récupéré par filtration puis séché sous vide. Rendement : 98%. *Caractérisations* : Tg : 30-37°C. RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 1,4 ppm (s, 9H, CCH_3), 1,55 ppm (d, 6H, $^3\text{J}=7,1\text{Hz}$, CHCH_3), 1,85 ppm (q, 2H, $^3\text{J}=6,3\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3,1 ppm (q, 2H, $^3\text{J}=6,2\text{Hz}$, CH_2NH), 4,15 ppm (t, 2H, $^3\text{J}=6,0\text{Hz}$, CH_2O), 4,35 ppm (q, 1H, $^3\text{J}=6,9\text{Hz}$, CH_3CHOH), 4,8 ppm (m, 1H, NH), 5,15 ppm (q, 2H, $^3\text{J}=7,1\text{Hz}$, CHCH_3). RMN ^{13}C (CDCl_3) : δ = 17 ppm (2C, CHCH_3), 20,7 ppm (1C, CH_3CHOH), 28,7 ppm (3C, CH_3C), 29,5 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 37,5 ppm (CH_2NH), 63,5 ppm (CH_2O), 67 ppm (CH_3CHOH), 69,5 ppm (2C, CH), 156 ppm (NHC=O), 170 ppm (CHC(O)O).

4.2 aminopropyl-poly(acide lactique)₈₀ : Du polylactide (4,5g, 2,98mmol) et le dichlorométhane distillé (54ml) sont introduits sous courant d'azote dans un ballon. On introduit l'acide trifluoroacétique (9ml, 0,11mol, Sigma 19H3648) et on place la solution sous agitation à température ambiante pendant une demi-heure, jusqu'à ce que le dégagement de CO_2 soit terminé. On évapore les solvants du milieu réactionnel à l'évaporateur rotatif. On ajoute 50ml de dichlorométhane et la solution est lavée deux fois par 50ml de NaHCO_3 en solution aqueuse (5%) puis deux fois par 50ml d'eau distillée jusqu'à ce que le pH des eaux de lavage soit neutre. La phase organique est séchée sur MgSO_4 puis filtrée. Le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif, puis le polymère est séché sous vide. Rendement : 95%. *Caractérisations* : RMN ^1H (CDCl_3) : δ = 1,55 ppm (d, 6H, $^3\text{J}=7,1\text{Hz}$, CH_3), 1,85 ppm (q, 2H, $^3\text{J}=6,3\text{Hz}$, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,8 ppm (q, 2H, $^3\text{J}=6,2\text{Hz}$, CH_2NH_2), 4,15 ppm (t, 2H, $^3\text{J}=6,0\text{Hz}$, CH_2O), 4,35 ppm (q, 1H, $^3\text{J}=6,9\text{Hz}$, CH_3CHOH), 5,15 ppm (q, 2H, $^3\text{J}=7,1\text{Hz}$, CH).

4.3 poly(benzyl glutamate)₂₀-propyl-poly(acide lactique)₈₀ : Le N-carboxyanhydride de L-glutamate de benzyle (2,70g, 10,26mmol) est introduit dans un ballon. Le polylactide déprotégé (3g, 1,98mmol) est solubilisé dans du dichlorométhane fraîchement distillé (15ml) puis introduit par canule. Le milieu réactionnel est placé sous agitation magnétique pendant trois heures à température ambiante. Le solvant est évaporé au rotavapor puis le polymère est séché sous vide primaire. Rendement : 85%. *Caractérisations* : RMN ^1H (TFA d) : δ = 1,55 ppm (m, 6H, CH_3), 1,95 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C=O}$), 2,35 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C=O}$), 4,60 ppm (m, 1H, O=CCHNH), 5,0ppm (m, 2H, CH), 5,25 ppm (m, 2H, CH_2Ph), 7,10 ppm (m, 5H, Ph). RMN ^{13}C ($\text{DMSO } d_6$) : δ = 17 ppm (CH_3), 27 ppm

($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 30 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$), 52 ppm ($\text{O}=\text{CCHNH}$), 66 ppm (CH_2Ph), 128-136 ppm (Ph), 168-170 ppm ($\text{OC}=\text{O}$), 172 ppm ($\text{NC}=\text{O}$).

5 **4.4 poly(acide glutamique)₂₀-propyl-poly(acide lactique)₈₀** : Le copolymère (5,2g, 20,8mmol d'ester de benzyle) est introduit dans un ballon et solubilisé dans l'acide trifluoroacétique (22ml, 0,29mol) à 10°C. On introduit l'acide méthane sulfonique (22ml, 0,34mol) et l'anisole (5,6ml, 0,05mol) sous courant d'azote et on laisse le milieu réactionnel trois heures sous agitation à 10 °C. Le polymère est précipité dans un large excès d'éther éthylique froid, récupéré par filtration, lavé avec de l'éther éthylique et séché sous vide. Rendement : 99%. *Caractérisations* :
 10 RMN ¹H (TFA d) : δ = 1,55 ppm (m, 6H, CH₃), 1,95 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 2,35 ppm (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}=\text{O}$), 4,60 ppm (m, 1H, $\text{O}=\text{CCHNH}$), 5,0ppm (m, 2H, CH). RMN ¹³C (DMSO d₆) : δ = 17 ppm (CH₃), 27 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 30 ppm ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 52 ppm (OCCHNH), 69 ppm (CH), 168-170 ppm ($\text{O}=\text{CO}$),
 15 172 ppm ($\text{O}=\text{CNH}$).

Exemple 5 : poly(acide lactique)₃₀-bloc-(acide glutamique)₁₀₀

20 **5.1 BOC-aminopropyl-poly(acide lactique)₃₀** : Le L-lactide (6g, 41,64mmol, Aldrich 16101-127) est introduit en boîte à gants sous atmosphère d'azote dans un ballon préalablement flammé. Le toluène, fraîchement distillé (27ml) est introduit par canule dans le ballon que l'on place sous agitation magnétique pendant une heure à 80°C. Le ter-butoxycarbonyl aminopropanol (0,73g, 4,20mmol, Fluka 381029/1) et le toluène fraîchement distillé (23ml) sont introduits dans un ballon
 25 préalablement flammé et placé sous agitation magnétique dans un bain à -10°C. La solution de diéthylzinc dans le toluène (1,9ml, 2,19mmol, 1,1M, Aldrich 72560-099) est introduite goutte-à-goutte dans cette solution. Le milieu réactionnel est alors laissé sous agitation magnétique à température ambiante. Au bout d'une
 30 heure on introduit la solution de L-lactide sous courant d'azote dans le milieu réactionnel que l'on place alors à 80°C sous agitation pendant une heure. La polymérisation est terminée par un ajout de 5ml d'acide acétique en solution dans le toluène (10%). Le milieu réactionnel est alors concentré à l'évaporateur rotatif et précipité dans un large excès de méthanol froid. Le polymère précipité est récupéré
 35 par filtration puis séché sous vide primaire. Rendement : 98%. *Caractérisations* : Tg : 30-37°C. RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 1,4 ppm (s, 9H, CCH₃), 1,55 ppm (d, 6H,

³J=7,1Hz, CHCH₃), 1,85 ppm (q, 2H, ³J=6,3Hz, CH₂CH₂CH₂), 3,1 ppm (q, 2H, ³J=6,2Hz, CH₂NH), 4,15 ppm (t, 2H, ³J=6,0Hz, CH₂O), 4,35 ppm (q, 1H, ³J=6,9Hz, CH₃CHOH), 4,8 ppm (m, 1H, NH), 5,15 ppm (q, 2H, ³J=7,1Hz, CHCH₃). RMN ¹³C (CDCl₃) : δ = 17 ppm (2C, CHCH₃), 20,7 ppm (1C, CH₃CHOH), 28,7 ppm (3C, CH₃C), 29,5 ppm (CH₂CH₂CH₂), 37,5 ppm (CH₂NH), 63,5 ppm (CH₂O), 67 ppm (CH₃CHOH), 69,5 ppm (2C, CH), 156 ppm (NHC=O), 170 ppm (CHC(O)O).

5.2 aminopropyl-poly(acide lactique)₃₀ : Le polylactide (3g, 1,39mmol) et le dichlorométhane fraîchement distillé (36ml) sont introduits sous courant d'azote dans un ballon préalablement flammé et relié à un bulleur. On introduit l'acide trifluoroacétique (6ml, 0,08mol, Sigma 19H3648) et on place la solution sous agitation à température ambiante pendant une demi-heure, jusqu'à ce que le dégagement de CO₂ soit terminé. On évapore les solvants du milieu réactionnel à l'évaporateur rotatif. On solubilise le polylactide dans 40ml de dichlorométhane. Cette phase organique est lavée deux fois par 40ml de NaHCO₃ en solution aqueuse (5%) puis deux fois par 40ml d'eau distillée jusqu'à ce que le pH des eaux de lavage soit neutre. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ puis filtrée. Le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif, puis le polymère est séché sous vide primaire. Rendement : 97%. *Caractérisations* : RMN ¹H (CDCl₃) : δ = 1,55 ppm (d, 6H, ³J=7,1Hz, CH₃), 1,85 ppm (q, 2H, ³J=6,3Hz, CH₂CH₂CH₂), 2,8 ppm (q, 2H, ³J=6,2Hz, CH₂NH₂), 4,15 ppm (t, 2H, ³J=6,0Hz, CH₂O), 4,35 ppm (q, 1H, ³J=6,9Hz, CH₃CHOH), 5,15 ppm (q, 2H, ³J=7,1Hz, CH).

5.3 poly(benzyl glutamate)₁₀₀-propyl-poly(acide lactique)₃₀ : Le N-carboxyanhydride de L-glutamate de benzyle (33g, 125,4mmol) fourni par Flamel Technologies est pesé et introduit en boîte à gants sous atmosphère d'azote dans un ballon préalablement flammé. Le polylactide déprotégé (2,9g, 1,33mmol) est solubilisé dans du dichlorométhane fraîchement distillé (165ml) puis introduit par canule. Le milieu réactionnel est placé sous agitation magnétique pendant trois heures à température ambiante. Le solvant est évaporé au rotavapor puis le polymère est séché sous vide primaire. Rendement : 93%. *Caractérisations* : RMN ¹H (TFA d) : δ = 1,55 ppm (m, 6H, CH₃), 1,95 ppm (m, 2H, CH₂CH₂C=O), 2,35 ppm (m, 2H, CH₂CH₂C=O), 4,60 ppm (m, 1H, O=CCHNH), 5,0ppm (m, 2H, CH), 5,25 ppm (m, 2H, CH₂Ph), 7,10 ppm (m, 5H, Ph). RMN ¹³C (DMSO d₆) : δ = 17 ppm (CH₃), 27 ppm (CH₂CH₂COO), 30 ppm (CH₂CH₂COO), 52 ppm

(O=C $\underline{\text{CH}}$ NH), 66 ppm ($\underline{\text{CH}_2}$ Ph), 128-136 ppm (Ph), 168-170 ppm (OC=O), 172 ppm (NC=O).

5 **5.4 poly(acide glutamique)₁₀₀-propyl-poly(acide lactique)₃₀** : Le copolymère (11g, 44,66mmol d'ester de benzyle) est introduit sous courant d'azote dans un ballon préalablement flammé. Il est solubilisé dans l'acide trifluoroacétique (100ml, 1,30mol). La solution est alors placée sous agitation à 10°C. On introduit l'acide méthane sulfonique (100ml, 1,55mol) et l'anisole (25ml, 0,23mol) sous courant d'azote. On laisse le milieu réactionnel trois heures sous agitation à 10°C,
10 puis on le précipite dans un large excès d'éther éthylique froid. Le polymère précipité est récupéré par filtration, lavé avec de l'éther éthylique et séché sous vide primaire. Rendement : 99%. *Caractérisations* : RMN ¹H (TFA d) : δ = 1,55 ppm (m, 6H, CH₃), 1,95 ppm (m, 2H, $\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\text{C=O}$), 2,35 ppm (m, 2H, CH₂ $\underline{\text{CH}_2}\text{C=O}$), 4,60 ppm (m, 1H, O=C $\underline{\text{CH}}$ NH), 5,0ppm (m, 2H, CH). RMN ¹³C (DMSO d₆) : δ = 17 ppm (CH₃), 27 ppm ($\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_2\text{COOH}$), 30 ppm (CH₂ $\underline{\text{CH}_2}\text{COOH}$), 52 ppm (OC $\underline{\text{CH}}$ NH), 69 ppm (CH), 168-170 ppm (O=CO), 172 ppm (O=CNH).

Exemple 6 : Formation de nanoparticules à partir du polymère de l'exemple 4

20 0.5 g de poudre du polymère de l'exemple 4 sont dissous dans 20 g d'un mélange 90/10 p/p THF/Ethanol. La solution est coulée au goutte à goutte dans 4 volumes d'une solution aqueuse de tampon phosphate 0.1 M. La dispersion obtenue est diffusante

Exemple 7 : Mesure du diamètre hydrodynamique des nanoparticules de l'exemple 6

La dispersion diffusante de l'exemple 6 est diafiltrée sur une membrane BIOMAX YM 300. Les nanoparticules se trouvent concentrées dans le rétentat. Elles sont ensuite dialysées à volume constant contre 800 ml d'eau faiblement tamponnée (tampon phosphate 2.10⁻⁴ M sans sel). Le diamètre hydrodynamique des particules, déterminé par
30 diffusion de lumière dynamique, est de 240 nm.

Exemple 8 : Mesure de la quantité maximale d'insuline absorbées sur les particules de polymère de l'exemple 7

Les nanoparticules de l'exemple 7, concentrées à 10 mg/ml en conditions isotoniques à pH 7,4 sont mises en contact à 25°C durant 16 heures, avec des concentrations croissantes d'insuline recombinante humaine en solution. La quantité d'insuline libre c'est à dire non adsorbée sur les nanoparticules, est déterminée par chromatographie d'exclusion stérique. A cette fin, la préparation est injectée dans une colonne TSK G4000 PWXL de TOSO HAAS. L'insuline libre est détectée par un détecteur UV AGILENT Series 1100 à 214 nm. On obtient ainsi l'isotherme d'adsorption de la figure 1. La valeur au plateau de cet isotherme permet de déterminer la quantité maximale, A_m , d'insuline adsorbée par unité de masse du copolymère sec. On trouve $A_m = 6\%$ p/p.

Exemple 9 : Formation de nanoparticules à partir du polymère de l'exemple 5

Le polymère de l'exemple 5 est obtenu en solution éthanolique concentrée à 26.7 g/l. Cette solution est directement coulée au goutte à goutte dans 4 volumes d'une solution aqueuse de tampon phosphate 0.1 M. La dispersion obtenue est diffusante.

20

Exemple 10 : Mesure du diamètre hydrodynamique des nanoparticules de l'exemple 9

La dispersion diffusante de l'exemple 9 est diafiltrée sur une membrane BIOMAX YM 300. Les nanoparticules se trouvent concentrées dans le retentat. Elles sont ensuite dialysées à volume constant contre 800 ml d'eau faiblement tamponnée (tampon phosphate 2.10^{-4} M sans sel). Le diamètre hydrodynamique des particules, déterminé par diffusion de lumière dynamique est de 220 nm.

30

Exemple 11 : Mesure de la quantité maximale d'insuline absorbées sur les particules de l'exemple 10

En procédant de manière identique à l'exemple 8, on obtient l'isotherme d'adsorption de l'insuline sur les nanoparticules du polymère de l'exemple 5. La valeur au plateau de cet isotherme permet de déterminer la quantité maximale, A_m , d'insuline adsorbée par unité de masse du copolymère sec. On trouve $A_m = 1 \text{ \% p/p}$.

Exemple 12 : Caractérisation des nanoparticules du polymère de l'exemple 3

Les nanoparticules du copolymère de l'exemple 3 sont préparées et isolées selon le procédé exposé dans les exemples 6 et 9. Le diamètre hydrodynamique des nanoparticules, mesuré par diffusion de lumière dynamique, est de 450 nm. La quantité maximale d'insuline adsorbée sur ces nanoparticules est mesurée comme exposé dans les exemples 8 et 11. On trouve : $A_m = 2,5\% \text{ p/p}$.

Exemple 13 : Formation de nanoparticules à partir du polymère de l'exemple 3

500 mg polymère, selon l'exemple 3, sont dissous dans 100ml de DMF en 10 min à 60°C. Cette solution est versée lentement un volume de 200ml d'éther diisopropylique à -40°C fortement agité. La solution est laissée à reposer à température ambiante pendant 2 heures puis centrifugée à 1500 tr/min pendant 20 min. Le culot est filtré sur Büchner n°4 et le précipité est lavé avec de l'éther diisopropylique. Le précipité est séché sous vide de pompe à palettes.

Exemple 14 : Pharmacocinétique et pharmacodynamie des PV-charges avec l'insuline chez le chien sain à jeun.

La préparation de microparticules PAHC-poly AAI de l'exemple 7, associées à de l'insuline (Basulin®) de l'exemple 8 a été injectée à des chiens, rendus diabétiques par pancréatectomie totale, et à jeun de la veille au soir. L'administration à 11 heures du matin

par voie sous cutanée thoracique de la préparation a été faite à la posologie de 0,5 UI/kg d'insuline par Kg de poids vif de l'animal. Le volume administré est compris entre 0,18 et 0,24 ml. Au temps -4, -2, 0, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 20, 24, 28, 32, 36, 40, 44 et 48 heures, 1 ml de sang sont prélevés par ponction jugulaire sous vide sur tube héparinate de sodium.

5 30 µl de sang total sont utilisés extemporanément pour mesure de la glycémie. Le tube est ensuite centrifugé, décanté et le plasma stocké à -20° C pour dosage de l'insuline. Les résultats présentés dans la figure 2 ci-après montrent un relargage de l'insuline jusqu'à 12 heures (trait plein) et un effet hypoglycémiant important qui se prolonge jusqu'à 20 heures (trait discontinu) après l'injection.

10

Cet exemple démontre la non-dénaturation de l'insuline en présence de **PV** selon l'invention.

15

De plus, cet exemple montre que les nanoparticules selon l'invention sont de **PV** qui peuvent être utilisées efficacement pour la libération modifiée de protéines.

REVENDICATIONS

1 - Suspension colloïdale de particules submicroniques susceptibles d'être utilisées, notamment pour la vectorisation de principe(s) actif(s) (PA), ces particules étant
5 des arrangements supramoléculaires individualisés, à base d'un copolymère amphiphile comprenant :

- ▶ au moins un bloc de polyaminoacide(s) (PAA) linéaire(s), hydrophile(s) à enchaînements α -peptidiques, les aminoacides hydrophiles AAI constitutifs de ce bloc PAA étant identiques ou différents entre eux ;
 - 10 ▶ et au moins un bloc d'au moins un polymère hydrophobe, formé par un Polymère d'Acide α -HydroxyCarboxylique (PAHC) – de préférence Polymère d'Acide Lactique (PAL) ou Polymère d'Acide Glycolique (PAG)-
- caractérisée en ce que :
- elle peut être obtenue spontanément en l'absence de tensioactif, par mise en
15 présence de copolymère amphiphile avec un liquide non-solvant des AAI ;
 - elle est stable même en l'absence de tensioactif ;
 - les AAI du copolymère sont au moins partiellement sous forme ionisée ;
 - les particules sont aptes à s'associer en suspension colloïdale à l'état non dissous, avec au moins un PA et à libérer celui-ci, notamment in vivo, de manière
20 prolongée et/ou retardée.

2°- Suspension selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par mise en solution du copolymère amphiphile dans un solvant organique et mise en présence de cette solution avec un liquide aqueux.

25

- 3 - Suspension selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que :
- les AAI sont des acides aminés hydrophiles AAI,
 - le rapport AHC/AAI est supérieur à 0,1
 - la longueur absolue du bloc PAHC est supérieure à 2 monomères, de
30 préférence supérieure à 10 monomères, et plus préférentiellement comprise entre 20 et 60 monomères.

4 - Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 ou 3, caractérisée en ce que le ou les blocs PAA à base d'AAI en comprennent au moins 5, de préférence au
35 moins 20, et plus préférentiellement encore au moins entre 30 et 100.

5 - Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que les particules sont des « diblocs » PAHC/AAI.

6 - Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le ou les AAI est(sont) choisi(s) parmi des aminoacides à chaîne latérale ionisable, les aminoacides naturels Glu et Asp sous forme carboxylique et/ou sous forme de sels étant particulièrement préférés.

7 - Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce qu'elle est aqueuse et stable.

8 - Solide pulvérulent, caractérisé en ce qu'il est obtenu à partir de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 7.

9 - Procédé de préparation du solide pulvérulent selon la revendication 8, caractérisée en ce que :

-1)- on met en œuvre ou on prépare par polymérisation de monomères d'acide(s) α -hydroxycarboxylique(s)-de préférence acide lactique ou glycolique- au moins un bloc polymère PAHC (de préférence de PAL ou PAG); ce bloc PAHC étant fonctionnalisé (avantageusement à au moins l'une de ses extrémités) par au moins un groupement réactif protecteur, de préférence choisi dans le groupe comprenant la BOC-éthanamine, BOC-aminopropanol (BOC = ButOxyCarbonyl) ;

-2)- on déprotège le bloc polymère PAHC de l'étape -1)- ;

-3)- on réalise une copolymérisation de monomères formés par des anhydrides de N-CarboxyAminoacides (NCA) d'amino-acides hydrophiles AAI et/ou par des anhydrides de N-CarboxyAminoacides (NCA) précurseurs d'amino-acides hydrophiles AAI et porteurs de groupements protecteurs, en présence d'au moins un solvant organique, de préférence choisi dans le groupe comprenant : la N-MéthylPyrrolidone (NMP), le DiMéthylFormamide (DMF), le DiMéthylsulfOxyde (DMSO), le DiMéthylAcétamide (DMAc), la pyrrolidone et le dichlorométhane ; ce dernier étant plus particulièrement préféré ;

- 4)- on ajoute le bloc polymère PAHC déprotégé de l'étape -2)- au milieu de polymérisation du bloc de poly-AAI, avant, pendant ou après la polymérisation;
- 5 -5)- éventuellement on déprotège les précurseurs d'amino-acides hydrophiles AAI pour obtenir un ou plusieurs blocs polyAAI ;
- 6)- on précipite le copolymère bloc PAHC-polyAAI obtenu à l'issue des étapes précédentes ;
- 10 -7)- on met en solution le précipité de copolymère bloc PAHC-polyAAI obtenu à l'étape -6)- et on met en présence cette solution avec un liquide contenant au moins un non-solvant du copolymère bloc PAHC-polyAAI, de préférence l'eau, ce liquide ayant un pH choisi de telle sorte que les AAI du copolymère
- 15 bloc PAHC-polyAAI soient au moins en partie ionisés ;
- 8)- éventuellement on associe au moins un principe actif **PA** hydrophile avec les particules ;
- 20 -9)- éventuellement on purifie la suspension de l'étape -7)- ;
- 10)- éventuellement on concentre la suspension de l'étape -7)- ;
- 11)- on élimine le milieu liquide pour recueillir le solide pulvérulent comprenant
- 25 les particules.

10 - Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que, le ou les bloc(s) PAHC fonctionnalisé(s) est (sont) introduit(s) avant et/ou au début de la polymérisation, qui se déroule de préférence à une température comprise entre 20 et 120°C à pression

30 atmosphérique normale.

11 - Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'on met en présence d'un milieu aqueux non-solvant des AAI, le solide pulvérulent selon la revendication 8 et/ou le solide pulvérulent

35 obtenu par le procédé selon la revendication 9 ou 10.

- 12 - Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes 1 à 7 et éventuellement 8 et/ou 9 et/ou 10 du procédé selon la revendication 9.
- 5 13 - Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'on effectue l'association du **PA** hydrophile aux particules, par mise en présence d'une phase liquide contenant ledit **PA** hydrophile avec la suspension colloïdale de particules.
- 10 14 - Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'on effectue l'association du **PA** hydrophile aux particules par mise en présence dudit **PA** à l'état solide avec la suspension colloïdale de particules.
- 15 15 - Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'on met en présence le solide pulvérulent selon la revendication 8 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 9, avec une phase liquide contenant le **PA** hydrophile.
- 20 16 - Procédé de préparation de la suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que l'on met en présence le solide pulvérulent selon la revendication 8 et/ou le solide pulvérulent obtenu par le procédé selon la revendication 9, avec le **PA** hydrophile sous forme solide et en ce que l'on disperse ce mélange de solides dans une phase liquide, de préférence une solution aqueuse.
- 25 17 - Produits intermédiaires du procédé selon la revendication 9 ou 10, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par des copolymères PAHC-polyAAI, de préférence polylactique ou glycolique-polyAAI.
- 30 18 - Suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et/ou obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 16 et/ou solide pulvérulent selon la revendication 8 comprenant un moins un principe actif hydrophile choisi, de préférence, parmi :
- 35 o les vaccins ;
- o les protéines et/ou les peptides, parmi lesquels les plus préférentiellement retenus sont : les hémoglobines, les cytochromes,

- les albumines, les interférons, les antigènes, les anticorps, l'érythropoïétine, l'insuline, les hormones de croissance, les facteurs VIII et IX, les interleukines ou leurs mélanges, les facteurs stimulants de l'hématopoïèse ;
- 5 ○ les polysaccharides, l'héparine étant plus particulièrement sélectionnée ;
- les acides nucléiques et, préférablement, les oligonucléotides d'ARN et/ou d'ADN ;
- 10 ○ des molécules non peptido-protéiques appartenant à diverses classes de chimiothérapie anti-cancéreuses et, en particulier, les anthracyclines et les taxoïdes ;
- et leurs mélanges.

- 15 **19 -** Spécialité pharmaceutique, nutritionnelle, phytosanitaire ou cosmétique, caractérisée en ce qu'elle comporte une suspension selon l'une quelconque des revendications 1 à 7 et/ou obtenue par le procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 16 et/ou du solide pulvérulent selon la revendication 8.

1/2

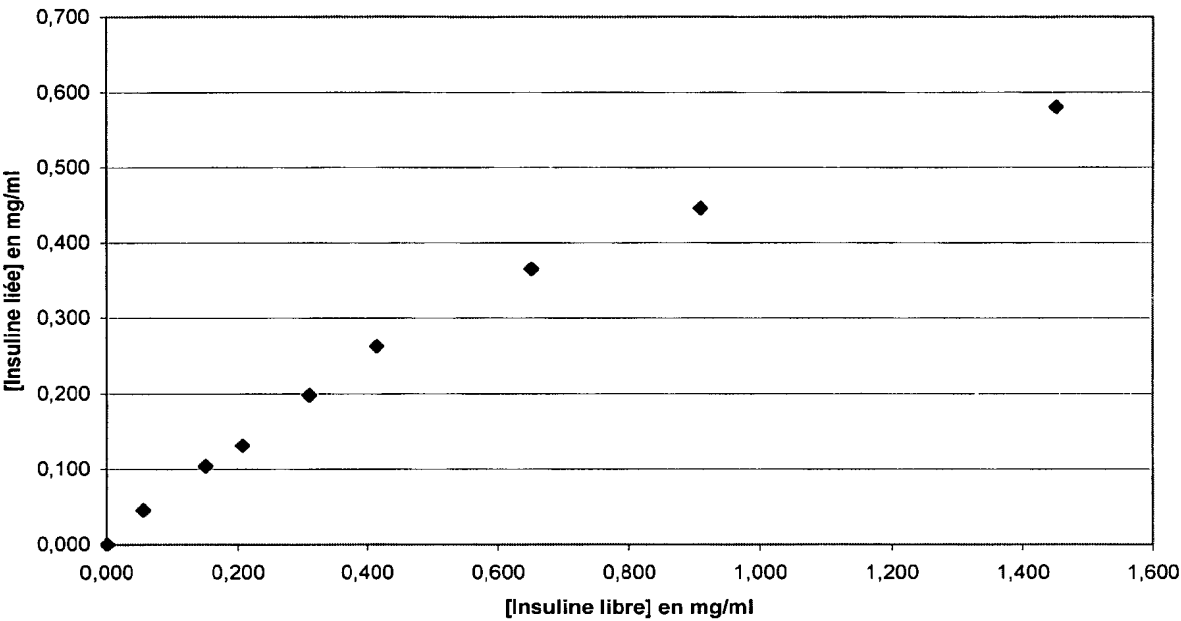


Figure 1

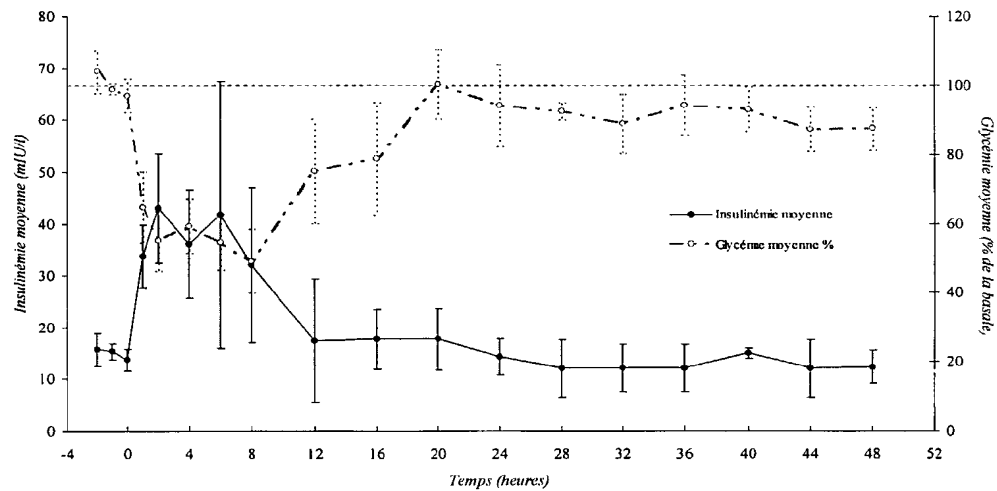


Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatio llocation No
PCT/FR 03/01278

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K9/51 B01J13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GONSALVES K E ET AL: "SYNTHESIS AND SURFACE CHARACTERIZATION OF FUNCTIONALIZED POLYLACTIDE COPOLYMER MICROPARTICLES" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 19, no. 16, 1 August 1998 (1998-08-01), pages 1501-1505, XP000668516 ISSN: 0142-9612 cited in the application the whole document	1-19
A	FR 2 786 098 A (FLAMEL TECHNOLOGIES SA) 26 May 2000 (2000-05-26) the whole document	1-19
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 August 2003

Date of mailing of the international search report

28/08/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Benz, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatic plication No
PCT/Fr 03/01278

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02 28521 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 11 April 2002 (2002-04-11) * abrégé * -----	1-19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internatio plication No
PCT/FR 03/01278

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2786098	A	26-05-2000	FR 2786098 A1	26-05-2000
			AU 1278000 A	13-06-2000
			EP 1131056 A1	12-09-2001
			WO 0030618 A1	02-06-2000
			JP 2002530323 T	17-09-2002
<hr/>				
WO 0228521	A	11-04-2002	FR 2814952 A1	12-04-2002
			AU 9396001 A	15-04-2002
			CA 2425906 A1	11-04-2002
			EP 1322411 A1	02-07-2003
			WO 0228521 A1	11-04-2002
<hr/>				

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No

PCT/FR 03/01278

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 A61K9/51 B01J13/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	GONSALVES K E ET AL: "SYNTHESIS AND SURFACE CHARACTERIZATION OF FUNCTIONALIZED POLYLACTIDE COPOLYMER MICROPARTICLES" BIOMATERIALS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS BV., BARKING, GB, vol. 19, no. 16, 1 août 1998 (1998-08-01), pages 1501-1505, XP000668516 ISSN: 0142-9612 cité dans la demande le document en entier -----	1-19
A	FR 2 786 098 A (FLAMEL TECHNOLOGIES SA) 26 mai 2000 (2000-05-26) le document en entier -----	1-19
A	WO 02 28521 A (FLAMEL TECHNOLOGIES) 11 avril 2002 (2002-04-11) * abrégé * -----	1-19



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

& document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

21 août 2003

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28/08/2003

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Benz, K

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 03/01278

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2786098 A	26-05-2000	FR 2786098 A1 AU 1278000 A EP 1131056 A1 WO 0030618 A1 JP 2002530323 T	26-05-2000 13-06-2000 12-09-2001 02-06-2000 17-09-2002
WO 0228521 A	11-04-2002	FR 2814952 A1 AU 9396001 A CA 2425906 A1 EP 1322411 A1 WO 0228521 A1	12-04-2002 15-04-2002 11-04-2002 02-07-2003 11-04-2002